

Petit vade-mecum de Microscopie



J-L Mainardi
27 Avril 2019

Architecture du Microscope → 3 systèmes optiques

Oculaires-S2

Objectifs-S1

Platine
porte-objet

Condenseur- S3

Source lumineuse

Tube de sortie
pour photographie

Statif

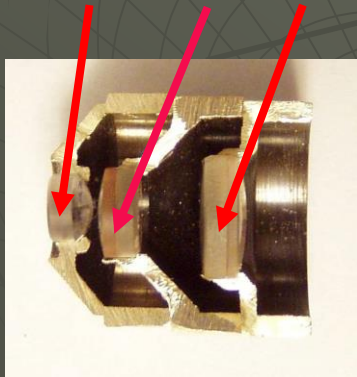
Déplacement
en XY

Double bouton
de mise au point



S1-Les objectifs sont les composants optiques les plus importants du microscope

→ L'objectif a pour rôle de donner une bonne image très agrandie de l'objet observé : **grandissement γ**



Les 4 objectifs classiques



Coupe d'un objectif montrant les lentilles

Indications :

Grandissement γ ex: 40

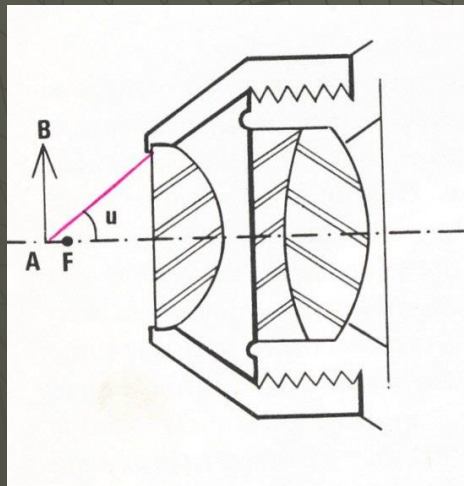
Ouverture Numérique O.N (oil) ex: 0,65

Longueur Tube ex: 160 mm (ou

Epaisseur Lamelle Couvre-Objet ex: 0,17 mm

La caractéristique la plus importante de l'objectif : l'ouverture numérique O.N

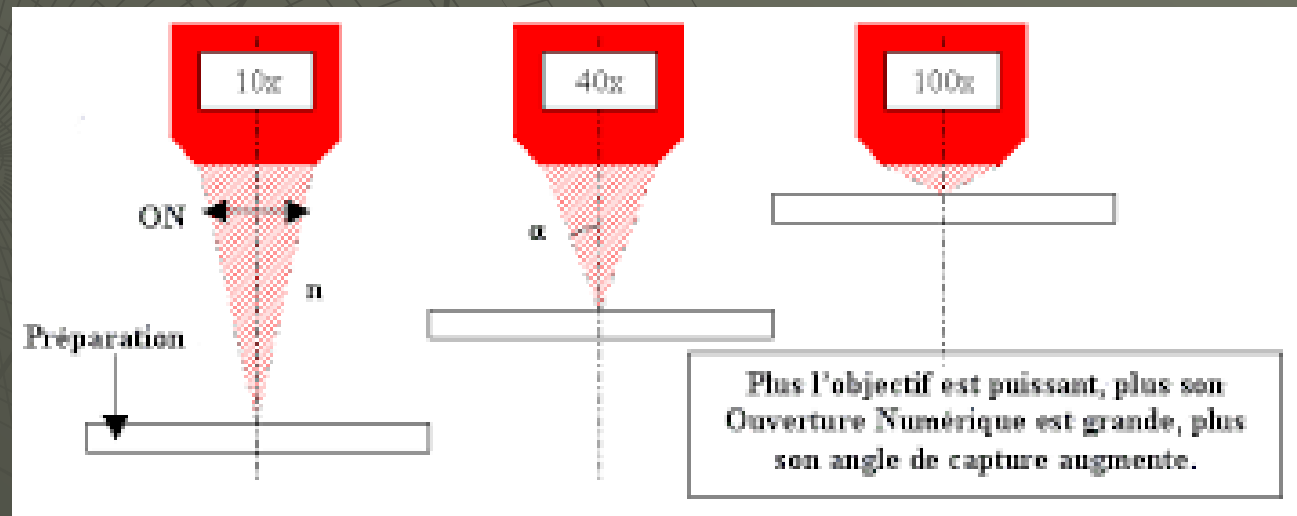
→ L'ouverture numérique O.N va déterminer le pouvoir séparateur PS de l'objectif (résolution) c'est-à-dire son aptitude à montrer les très fins détails



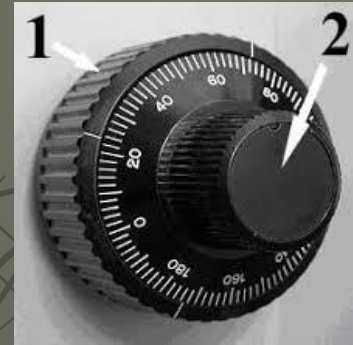
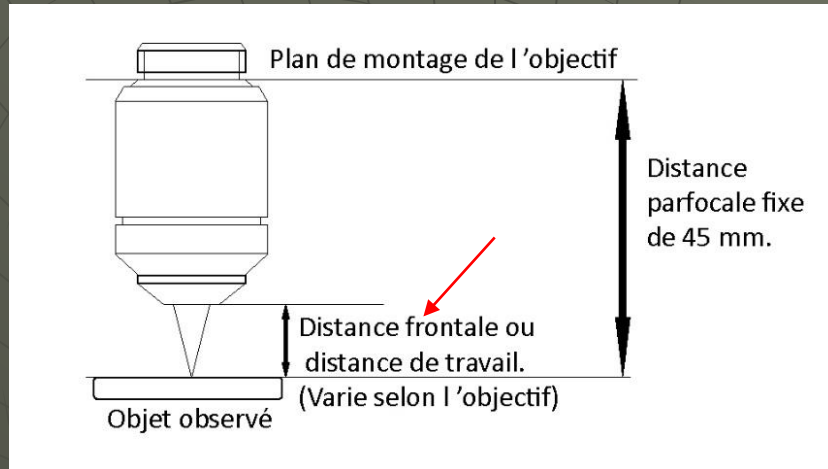
$$O.N = n \cdot \sin u$$

n = indice de réfraction
→ conicité des rayons à l'entrée de l'objectif

$$\text{Résolution} = \text{PS} = 0,33 / O.N \text{ en micromètres}$$



Distance Frontale : distance entre le bas de l'objectif et l'objet observé



Graduation de la vis micrométrique 2
1 micron

→ Faire la mise au point (focalisation)
c'est régler précisément la distance frontale



Chaque objectif a sa propre distance frontale



La normalisation des caractéristiques des microscopes permet la parfocalisation

(Il y a aussi des objectifs à lentille frontale rentrante à ressort)

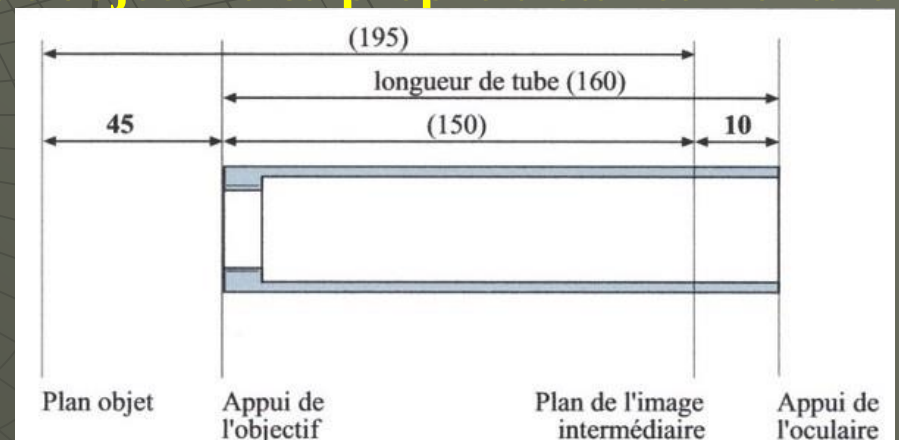


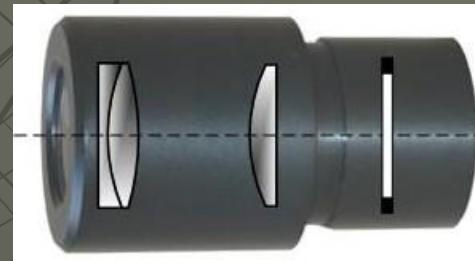
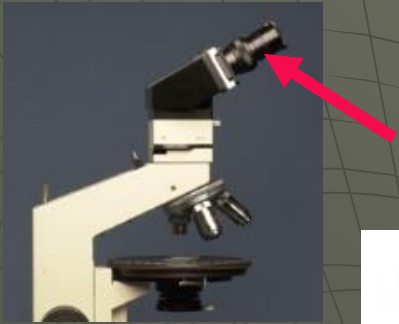
Figure 7: Principales distances normalisées du microscope (en mm)

Les différents objectifs de microscope

<u>Grandissement</u> γ	Ouverture Numérique	Pouvoir séparateur	Distance frontale	Emploi
$\gamma = 4$	O.N = 0,10	3,3 μm	35 mm	Sélection de la zone
$\gamma = 10$	O.N = 0,25	1,32 μm	7 mm	Centrage de l'objet
$\gamma = 40$	O.N = 0,65	0,51 μm	0,6 mm	Grossissement standard
$\gamma = 60$	O.N = 0,85	0,39 μm	0,5 mm	Grossissement standard (+)
$\gamma = 100$ <i>oil</i>	O.N = 1,25	0,26 μm	0,3 mm	Grossissement maxi-Immersion dans huile

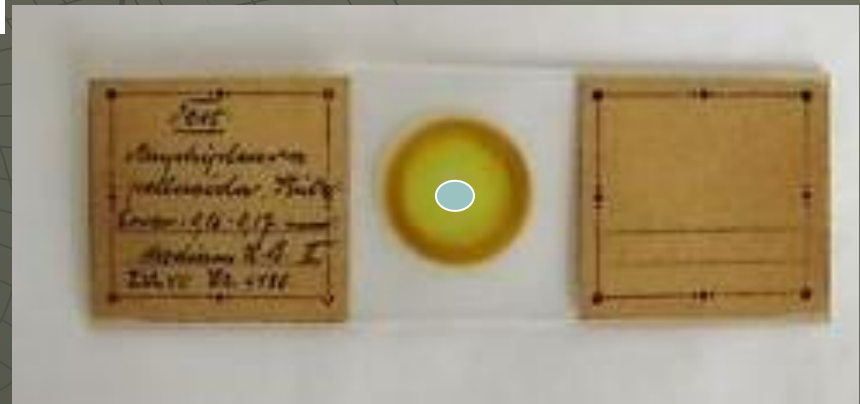
S2-Les oculaires = loupes de très bonne qualité optique

→ Le rôle de l'oculaire est de grossir l'image donnée par l'objectif : grossissement Goc



Indications :

- Largeur du champ : ex WF
- Grossissement : ex 10 x
- Indice de champ IC : ex 18 mm (+ lunettes)



● Formule de détermination du champ visible = Indice de champ / Grandissement obj

Le Grossissement G_m du microscope

→ La formule donnant le grossissement du microscope en fonction de l'objectif et de l'oculaire employés est

$$G_m = \gamma_{obj} \times G_{oc}$$

avec: γ_{obj} = grandissement de l'objectif employé
 G_{oc} = grossissement de l'oculaire employé

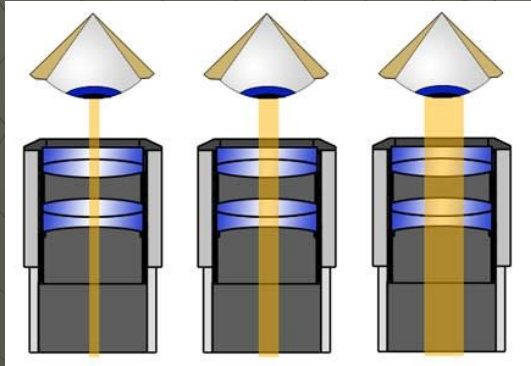
Exemple : objectif de grandissement $\gamma_{obj} = 40$
oculaire de grossissement $G_{oc} = 10 \times$ et $IC = 18 \text{ mm}$

$$G_m = 40 \times 10 = 400 \times$$

diamètre du champ observé sur la préparation:

$$18 \text{ mm} / 40 = 0,45 \text{ mm}$$

L'œil à l'oculaire du microscope : l'adaptation œil / microscope



- le faisceau de lumière sort de l'oculaire et rentre dans l'œil par la pupille
 - L'œil est le plus performant si le faisceau de lumière a un diamètre compris entre 0,6 mm et 0,8 mm
- Si le faisceau sortant a un diamètre inférieur à 0,6 mm les défauts de la cornée et de l'humeur vitrée dégradent fortement l'image fournie par l'objectif

Le diamètre du faisceau de sortie est donné par la relation:

$$D_s = 500 \text{ O.N} / G_m$$

Le diamètre augmente quand ON augmente

Le diamètre diminue quand G_m augmente

Il existe donc un optimum pour chaque objectif employé entre le grossissement G_m et l'ouverture numérique ON de l'objectif

L'optimum de grossissement est donné par : $G_m \text{ opt} = 750 \times (\text{O.N})$
(relation donnée pour un objectif standard)

L'optimum Grossissement Gm / Oculaire

Objectif	Application de la formule	Détermination de l'oculaire	Remarques
$\gamma = 4$ ON=0,10	Gm opt=75 x	G oc =18,7 x	G oc= 15 x OK G oc = 10 x sous-employé
$\gamma = 10$ ON=0,25	Gm opt = 187 x	G oc = 18,7 x	G oc = 15x OK G oc= 10 x sous-employé
$\gamma = 40$ ON=0,65	Gm opt = 487 x	G oc = 12,2 x	G oc= 15 x acceptable
$\gamma=60$ ON=0,85	Gm opt = 637 x	G oc= 10,7 x	G oc = 15 x inadapté
$\gamma = 100$ ON=1,25	Gm opt = 937 x	G oc= 9,4 x	G oc= 15 x totalement inadapté

S3-Le Condenseur : le maître de la lumière

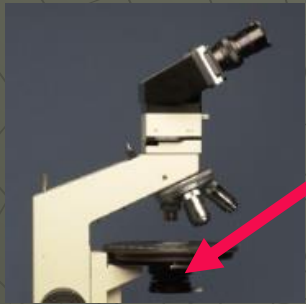
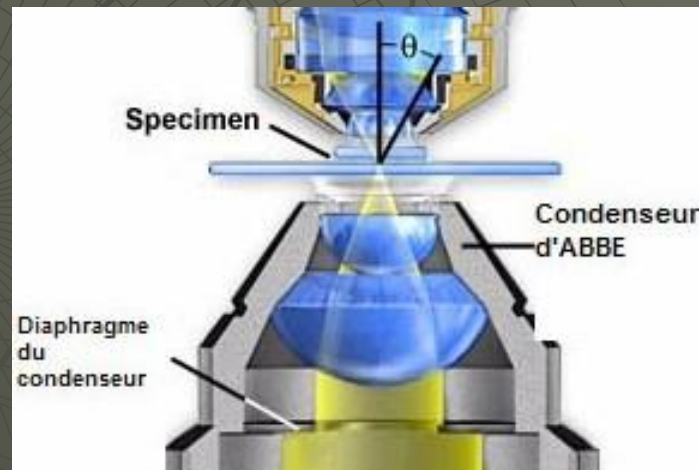
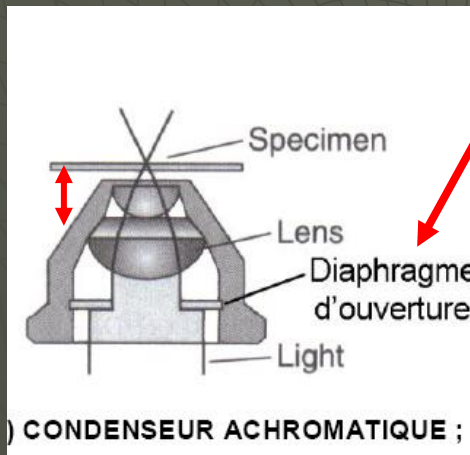


Fig. 14 Ce condenseur achromatique-aplanatique (Wild) utilise 6 lentilles

→ Le rôle du condenseur est d'adapter le cône de lumière issu de la source lumineuse à l'ouverture numérique ON de l'objectif

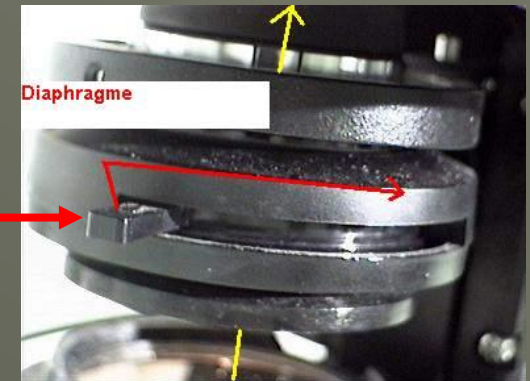


Condenseur avec repères

Cette adaptation se fait en positionnant la hauteur du condenseur et en réglant le diaphragme iris d'ouverture : ce réglage est fondamental

Régler le diaphragme d'ouverture pour utiliser le microscope au maximum de ses possibilités

- Le challenge en microscopie d'observation d'objets incolores est de trouver le bon équilibre entre résolution et contraste : cet équilibre dépend du réglage du condenseur
- On règle à priori de façon générale le condenseur en position haute (réglage de base)
Le réglage du diaphragme d'ouverture devient alors **fondamental** (surtout avec l'emploi d'un objectif à fort grossissement)
- Ce réglage va permettre d'éclairer de façon homogène la préparation et ainsi optimiser le pouvoir séparateur PS de l'objectif et le bon contraste de l'image fournie par l'objectif



(quand on augmente le contraste, le PS diminue d'où optimum à rechercher !)

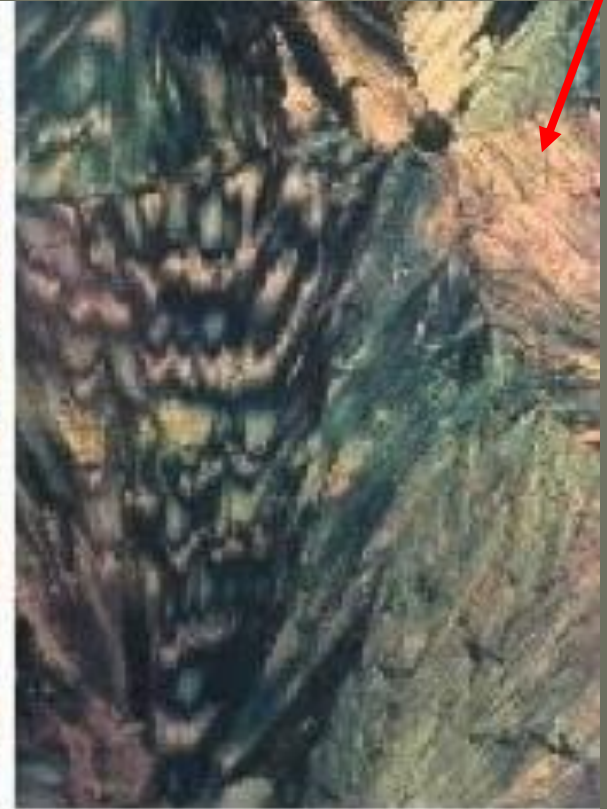


Contraste insuffisant

Diaphragme d'ouverture
trop ouvert



Correct



Résolution basse

Diaphragme d'ouverture
trop fermé

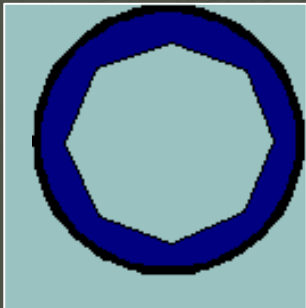
Effet du réglage du condenseur

Règles pratiques du réglage du condenseur

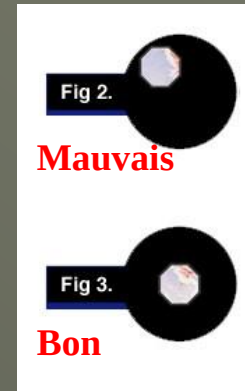
1-Verification du centrage du condenseur:
On enlève un oculaire et on regarde dans le tube
(on peut se servir d'une croix que l'on pose sur
la source lumineuse)

2- Vérification position du condenseur:
position haute

3- vérification du positionnement du
diaphragme d'ouverture



On ferme le diaphragme à # 80% de la valeur de l'ON
de l'objectif (diamètre de la pupille)(surtout avec
les objectifs de grandissement important)-ce réglage se fait
en enlevant un oculaire et en regardant dans le tube



Emploi de l'objectif à immersion d'huile

On a vu précédemment

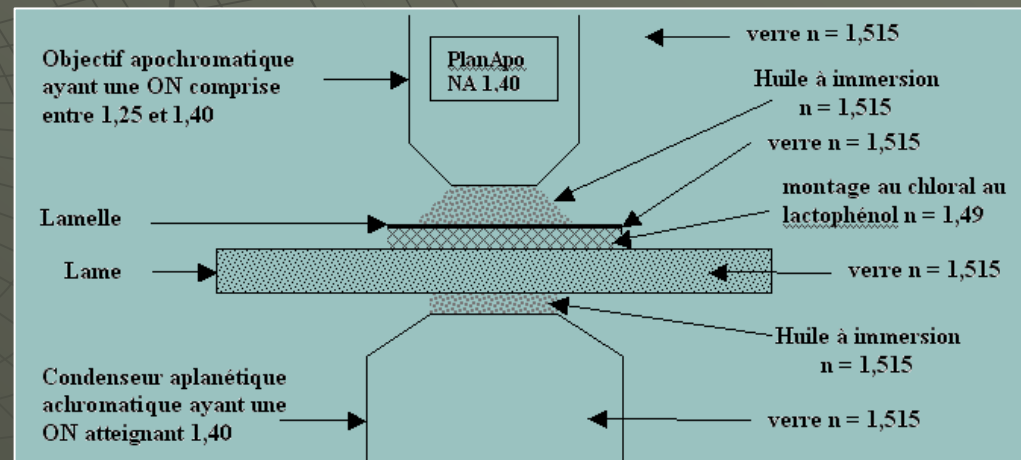
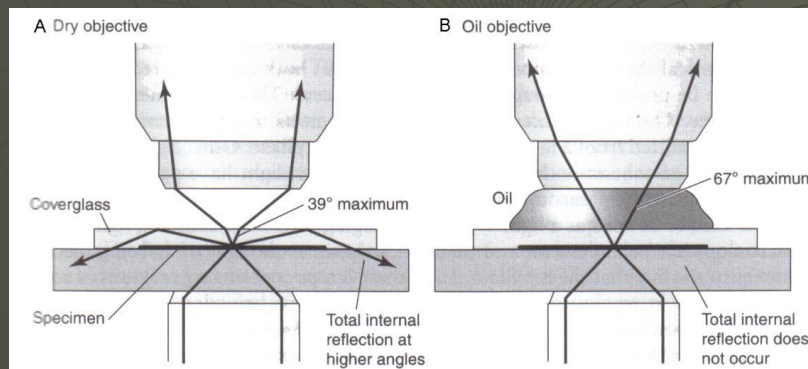
1-que le grossissement optimal était donné par la relation : $G_{opt} = 750 \times O.N$

2 la relation donnant l'Ouverture numérique est $O.N = n \cdot \sin u$

Si on veut obtenir des valeurs élevées pour G_{opt} il faut augmenter O.N

Cela s'obtient en augmentant l'indice de réfraction n c'est-à-dire en immergeant l'objectif dans de l'huile d'immersion $n' = 1,55$ (air $n = 1$)

Dans ce cas l'O.N peut atteindre 1,25 et (même plus)

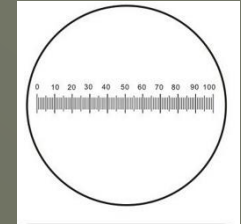
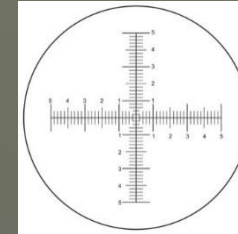


L'emploi d'un micromètre

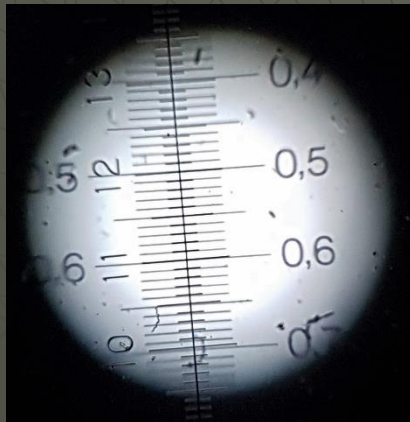


Micromètre objectif

1 petite division = 0,01 mm = 10 microns

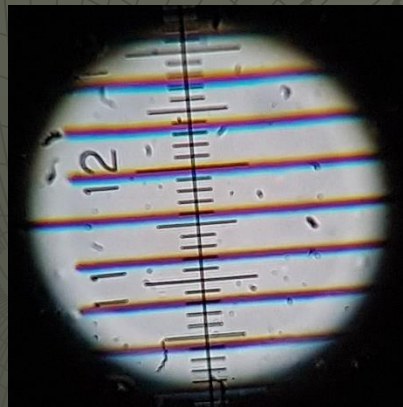


Oculaire micrométrique $G_{oc} = 10 \times$



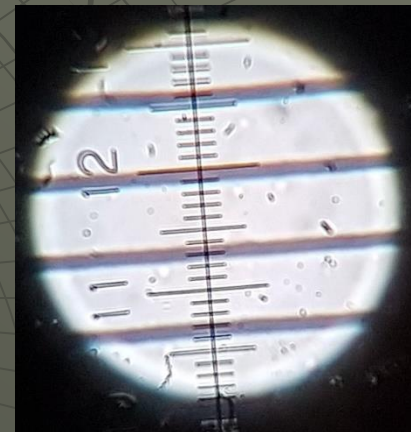
Objectif 10

1 div oculaire = 10 μ



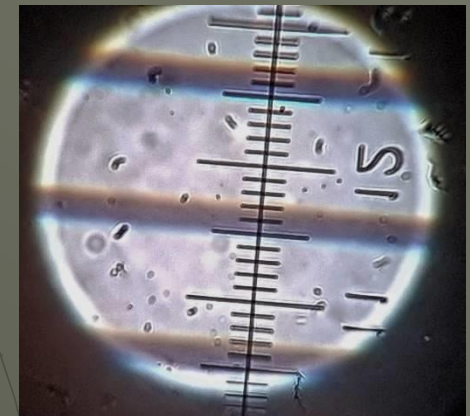
Objectif 40

1 div oculaire = 2,5 μ



Objectif 60

1 div oculaire = 1,66 μ



Objectif 100

1 div oculaire = 1 μ

Formule : 1 division = 1000 / G_m (si oculaire micro $G_{oc} = 10 \times$)



Diatomée :

Objectif 60

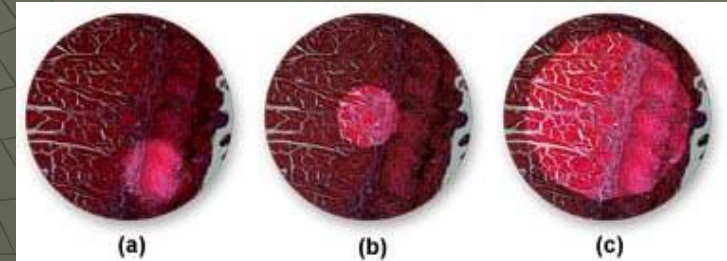
Oculaire micrométrique Goc = 10 x

1 div = $1000 / 600 = 1,67$ micron

→ Structures résolues = 0,8 micron

En résumé

- **Avant de commencer la séance :**
 - Vérifier l'agencement des objectifs sur le revolver et le sens de montée des grossissements
 - Vérifier la parfocalisation
 - Vérifier le centrage du condenseur
 - Vérifier que le condenseur est en position haute
 - Vérifier l'oculaire employé
 - Si emploi d'un micromètre :
vérifier l'étalonnage de l'oculaire



Réglage du Condenseur

- **En-cours de séance :**
 - Régler selon les besoins l'intensité de l'éclairage (rhéostat)
 - Si utilisation de d'objectif à fort grossissement:
régler le diaphragme d'ouverture (contraste)

La préparation microscopique

Lame porte-objet (LPO) : épaisseur = 1,1 mm

Lamelle couvre-objet (LCO) : épaisseur = 0,17 mm

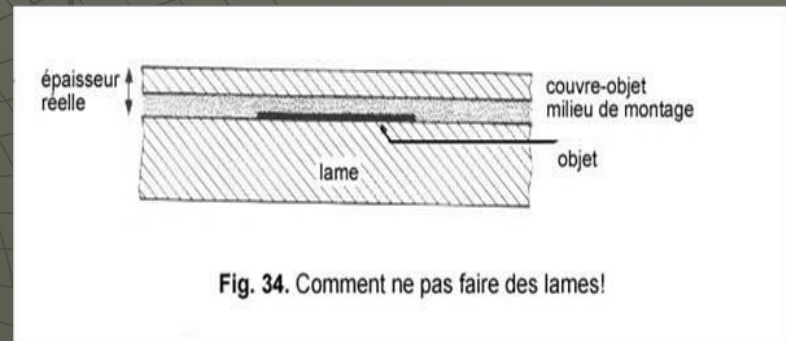
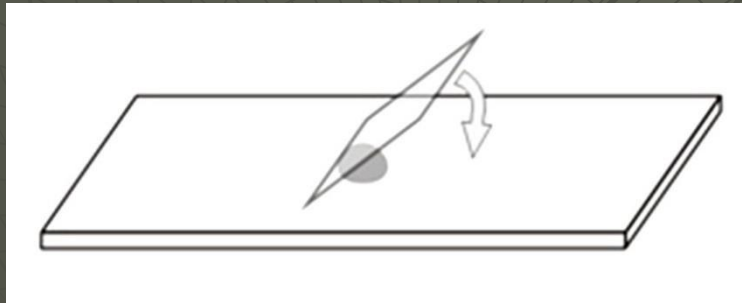
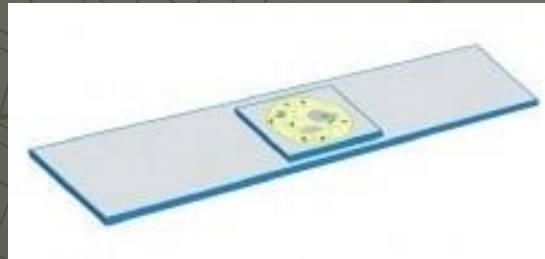
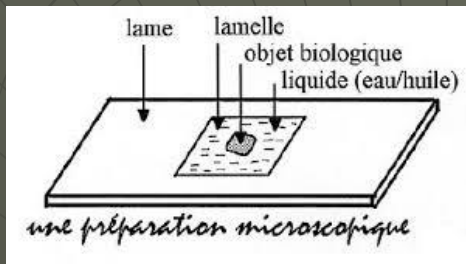
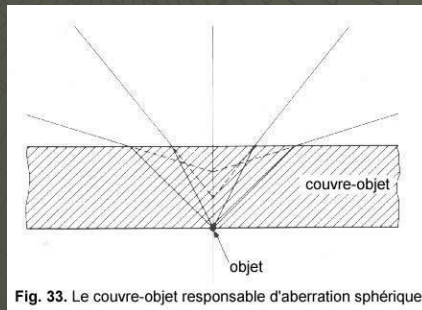


Fig. 34. Comment ne pas faire des lames!

Respect de
l'épaisseur
de la LCO



l'objet est toujours trop épais !
(attention à la lame de liquide
au dessus de l'objet : poser l'objet
sur la LCO !)

Augmenter les contrastes autrement en employant des colorants ou des réactifs

→ Pour rendre l'observation plus aisée surtout si l'objet est transparent on emploie des colorants qui sont diversement absorbés par les parties de l'objet.

Les colorants les plus utilisés sont:

- le Rouge Congo Ammoniacal
- Le Bleu coton (au lactophénol)
- Le Rouge Soudan
- l'Eosine

D'autres produits en établissant des réactions spécifiques font office de colorants

- Melzer (Chloral iodé) (amyloïde = bleu-noir)(desxtrinoïde= brun-rouge)
- Lugol
- Carmin acétique
- Sulfovanilline
- Fuchsine de Ziehl

→ Dans tous les cas, l'observation est facilitée soit par augmentation du contraste soit par coloration différentielle.

